

Seleção de microrganismos endofíticos de milho (*Zea mays* L.) produtores de fitohormônios.

Vitória Palhares Ribeiro⁽¹⁾ **Bianca Braz Mattos**⁽²⁾; **Crísia Santos de Abreu**⁽³⁾; **Cássia Naiara Soares Almeida**⁽⁴⁾. **Christiane Abreu de Oliveira**⁽²⁾ **Ivanildo Evódio Marriel**⁽²⁾

⁽¹⁾ Estudante; Centro Universitário de Sete Lagoas; Sete Lagoas, MG; vitypalhares18@hotmail.com;

⁽²⁾ Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 285, 35701-970, Sete Lagoas, MG; ⁽³⁾ Mestranda Universidade Federal de São João Del Rei - UFSJ, Sete Lagoas, MG; ⁽⁴⁾ Estudante; Centro Universitário de Sete Lagoas; Sete Lagoas, MG;

RESUMO: Associadas à cultura de milho encontram-se bactérias que possuem características para a produção de fitohormônios. Neste contexto, o isolamento e caracterização de microrganismos que habitam o interior das plantas (endofíticos) com potencial para a promoção do crescimento de plantas, assim como a seleção de isolados com características desejáveis como a produção de AIA (ácido indol acético) são passos importantes nos estudos que têm por finalidade intensificar a produção e promover a sustentabilidade dos sistemas agrícolas. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias endofíticas de milho com características para produção de AIA. Foram isoladas 27 estirpes bacterianas provenientes de folhas, raízes e seiva de milho. Em seguida, esses isolados foram avaliados quanto à capacidade da produção do fitohormônio AIA. A produção foi mais significativa para os isolados 1937 e 1934 (*Pantoea ananatis*) com uma produção de 242,61 e 262,61 µg mL⁽¹⁾, respectivamente e 2012 (*Bacillus* sp.) com a produção de 168,44 µg mL⁽¹⁾ suplementado com triptofano. Os isolados foram identificados baseados na sequência do 16S rDNA como pertencentes aos gêneros *Enterobacter* sp, *Pantoea* sp e *Bacillus* sp. Foi possível concluir, que 18 das estirpes bacterianas testadas, possuem características promissoras de produção de AIA, justificando futuras análises de inoculação em plantas.

Termos de indexação: bactérias, ácido indol acético, AIA.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea da família Poaceae, da tribo Maydeae, do gênero *Zea* que compreende cinco espécies, sendo uma delas a *Zea mays* (Borém, 1999). Esta cultura tem se destacado dentro do cenário agrícola brasileiro pela alta produtividade e conseqüente demanda por nutrientes, onerando os custos de produção desta cultura.

O uso de microrganismos como agentes de promoção do crescimento e biodisponibilização de nutrientes, especialmente os localizados no interior

da planta (endofíticos), pode ser considerado uma prática agrícola promissora, em termos econômicos e ambientais. Quanto à produção do hormônio, a síntese de auxinas, particularmente o ácido indol acético (AIA) promove o crescimento das raízes e a proliferação de pelos radiculares, o que pode melhorar a absorção de nutrientes e água do solo e, conseqüentemente, melhorar o crescimento da planta (Caballero, Mellado et al. 2006.).

A presença de microrganismos endofíticos já foi demonstrada em diferentes culturas de interesse econômico, tais como o milho (Araújo et al. 2000), mas poucos estudos têm sido realizados com relação ao potencial de uso destes microrganismos como bioinoculantes desta cultura.

Esta comunidade endofítica é constituída principalmente por fungos e bactérias e, ao contrário dos microrganismos patogênicos, não causam prejuízos à planta hospedeira (Neto et al., 2003). Um grande número de trabalhos tem mostrado o potencial do uso de microrganismos endofíticos como agentes no controle biológico de doenças e pragas em plantas, na promoção de crescimento vegetal, no aumento da tolerância ao estresse pela seca ou calor entre outros benefícios (Araújo et al., 2002; Márquez et al., 2007; Cao et al., 2009; Hamayun et al., 2009).

Quanto à promoção de crescimento, o principal hormônio relatado é o ácido indol acético, que é um regulador de crescimento vegetal da classe das auxinas, produzido no meristema apical das plantas, tendo a função de promover o crescimento de raízes e caules através do alongamento celular (Centellas et al. 1999). A produção de auxinas também pode ser realizada por bactérias; que, quando em associação com as plantas, podem promover o crescimento vegetal (Patten E Glick, 1996; Ryu; PATTEN, 2008; Kochar et al., 2011; López; Valdez et al., 2011).

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou selecionar e caracterizar microrganismos endofíticos com capacidade de produzir ácido indol acético (AIA).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 27 estirpes de bactérias

endofíticas isoladas de folhas, raízes e seiva da cultura de milho, pertencentes à coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo. Estas estirpes foram também classificadas anteriormente como eficientes na solubilização e mineralização de fosfato.

Isolamento de microrganismos endofíticos

O material vegetal foi coletado em área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, município de Sete Lagoas-MG. Os microrganismos endofíticos foram isolados de raízes, folhas e seiva de milho em estágio de florescimento. As folhas, as raízes e os colmos foram lavados em água corrente e em seguida desinfestadas superficialmente por meio de imersão em álcool 70 % por 2 minutos; 5 minutos em hipoclorito de sódio a 2,5 % de cloro ativo (v/v) e novamente em álcool 70 % durante 30 segundos. Ao final do procedimento, todo o material foi lavado quatro vezes em água destilada esterilizada. Para a verificação da eficiência do processo de desinfestação, alíquotas da água destilada (0,1 mL) da última lavagem dos tecidos vegetais foram inoculadas em meio Ágar

Batata Dextrosado (BDA) e incubadas a 25-28 °C durante 10 dias. Para isolamento de bactérias endofíticas, amostras de 10 g das raízes e das folhas desinfestadas foram trituradas com areia estéril e, então, diluições seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁵ foram realizadas. De cada uma das diluições, alíquotas de 100 microlitros foram plaqueadas no meio BDA suplementado com 100 µg/mL cloranfenicol. A seiva foi extraída por meio de ar comprimido. As placas foram incubadas a -28 °C por um período de sete dias e os diferentes morfotipos de bactérias foram contados (UFC/g). Controle negativo para este ensaio também foi realizado. Representantes dos diferentes isolados obtidos foram preservados, em duplicata, em glicerol 30% a -80 °C, e também mantidos por repiques sucessivos em tubos de penicilina contendo BDA a 4 °C.

Seleção de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA).

Com a finalidade de avaliar a produção de auxina, 27 microrganismos foram crescidos em meio de cultura TSB líquido, suplementado com diferentes concentrações de triptofano 0, 10, 20, 40, 80 µg ml⁽¹⁾, conforme descrito por Patten e Glick (1996). O inóculo de cada bactéria foi padronizado pela leitura da densidade ótica =1,0 e o ajuste da concentração de células em cada amostra foi realizado com a adição de solução salina. Após a inoculação, os microrganismos foram incubados a 30°C, sob agitação e na ausência de luz, por 48h. Posteriormente, as células foram removidas por

centrifugação (6000 rpm por 10 minutos) e a produção de auxina foi determinada colorimetricamente utilizando reagente de Salkowski (TANG & BONNER, 1947) e curva padrão de ácido indol acético. Os testes foram realizados em triplicata e os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas utilizando o teste de Scott-knott (P<0,05).

Sequenciamento de DNA

A identificação molecular das estirpes foi realizada com base na identidade de sequências 16S rDNA de isolados bacterianos endofíticos de raiz, seiva e folha de milho, utilizando os *primers* universais F968 e R1401(Nubel et al., 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram testados 27 isolados bacterianos previamente classificados como eficientes na solubilização de fosfato (dados não mostrados), resultando em 24 isolados com a capacidade de produzir o hormônio AIA, com diferença significativa entre esta produção (Figura 1). BIANCO & DEFEZ (2010) estabeleceram uma relação entre a expressão de genes relacionados com solubilização de P e a produção de auxinas. Isso demonstra o potencial desses endofíticos para a aplicação biotecnológica e ou uso como bioinoculantes na agricultura, pois apresentam mais de uma característica desejável para o incremento da produção.

Os isolados 1934 e 1937 foram as que apresentaram maior capacidade de produzir este hormônio, se diferindo significativamente das demais. Estes dois isolados foram identificados como sendo da espécie *Pantoea ananatis* (Tabela 1). O segundo gênero que apresentou terceira maior produção de AIA foi *Bacillus*, com 168,44 µg mL de produção deste hormônio. A primeira espécie tem sido relatada na literatura como agente causador da mancha branca em milho. Goszczynska et al. (2007) relataram *Pantoea ananatis* e outra espécie de *Pantoea* spp., ainda não identificada, como agentes fitológicos da podridão marrom em colmos de milho. Segundo estes autores, a inoculação em colmo do milho de isolados de *P. ananatis* resultou, também, em lesões foliares nas plantas inoculadas. Além do milho, *P. ananatis* é conhecida como patógeno de outras espécies vegetais como a cebola, o eucalipto, o arroz, o melão, o sorgo. Este fato pode inviabilizar seu uso como inoculante, entretanto, a identificação genética possibilitou a identificação de cepas do gênero *Bacillus* (2012) que tem sido comumente usadas como inoculantes.

Com relação à caracterização molecular das estirpes bacterianas (Tabela 1). Em geral, observaram-se valores de similaridades entre 90% e 100 % com as espécies *Enterobacter* sp, *Pantoea*

sp e *Bacillus* sp. A produção destes reguladores já foi relatada em bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Methylobacterium*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (Fuentes- Ramirez et al. 1993; Bastián et al., 1998; Cassán et al., 2001, Koenig et al., 2002).

Neste trabalho, um total de 88,8 % das bactérias endofíticas foram positivas para a síntese de AIA via L- triptofano. Estudos relatam a existência de mais de uma rota para a síntese de AIA em muitas bactérias sendo que a maioria delas é via triptofano (Patten e Glick, 1996). A transformação de triptofano em AIA pode ser realizada por microrganismos que produzem uma conversão oxidativa quando o triptofano se encontra em presença de peroxidases e de radicais livres.

CONCLUSÕES

Há variabilidade genética e quanto à produção de AIA entre as estirpes bacterianas endofíticas avaliadas. Dos endofíticos testados, 18, possuem características significativas para a promoção do crescimento vegetal podendo, neste sentido, ser considerados como candidatos para futuros testes de inoculação em plantas.

AGRADECIMENTOS

A FAPEMIG, CNPq, Embrapa Milho e Sorgo e a UNIFEMM, pela infraestrutura e recursos financeiros para a execução do trabalho.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J.M.; SILVA, A.C.; AZEVEDO, J.L. (2000) Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology Technology** 43: 447-451 2000.

ARAÚJO, W.L., LIMA, A.O.S., AZEVEDO, J.L., MARCON, J., KUKLINSKY-SOBRAL, J., LACAVA, P. (2002) **Manual: Isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba, p. 86.

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V. BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3 acetic acid and gibberellins A1 e A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 7 11,1998.

CABALLERO MELLADO, J. Microbiologia agrícola y interacciones microbianas con plantas. **Revista Latino-americana de Microbiologia**, México, v. 48, n. 2, p. 154 -161 2006.

CAO, R., LIU, X., GAO, K., MENDGEN, K., KANG, Z., GAO, J., DAI, Y., WANG, X. Mycoparasitism of

endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. **Current Microbiology** 59 (6) 584-592, 2009.

CASSÁN, F.D.; LUCANGELI, C.D.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P.N. *Azospirillum* spp. Metabolize [17, 17-2H₂] gibberellin A20 to [17, 17-2H₂] gibberellin A1 in vivo in dy ice mutant seedlings. **Plant Cell Physiology**, v. 42, p. 763 767, 2001.

CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L.; MULLER, N. T. G.; GOTTINARI, R. A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento *in vitro* da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 2, p 181-186, fev. 1999.

FERREIRA, D.F. SISVAR - **Sistema de análise de variância**. Versão 5.3. DEX. Lavras-MG: UFLA, 2010.

FUENTES-RAMIREZ L. E; JIMENEZ-SALGADO T.; ABARCA-OCAMPO I. R.; CABALLERO-MELLADO J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of México. **Plant Soil**, v.154, p. 145-150, 1993.

GOSZCAYNSKA, T.; BOTHA, W. J.; VENTER, S. N.; COUTINHO, T. A. Isolation and identification of the causal agent of Brown stalk rot, a new disease of maize in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v. 91, p. 711-718, 2007.

HAMAYUN, M., KHAN, S.A., KIM, H.Y., CHAUDHARY, M.F., HWANG, Y.H., SHIN, D.H., KIM, I.K. LEE, B.H., LEE, I.J. (2009). Gibberellin production and plant growth enhancement by newly isolated strain of *Scolecobasidium tshawytschae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 19 (6):560-565.

KOCHAR, M.; UPADHYAY, A.; SRIVASTAVA, S. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression **Research in Microbiology Granada**, v. 162, p. 426-435, mar. 2011.

KOENIG, R.L.; MORRIS, R.O.; POLACCO, J.C. tRNA is the source of low-level trans-zeatin production in *Methylobacterium* spp. **Applied and Environmental Microbiology** , v.184, p.1832-1842, 2002.

LÓPEZ-VALDEZ, F.; FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; CEBALLOS-R AMÍREZ, J. M.; MARSCH, R.; OLALDE-PORTUGAL, V.; DENDOOVEN, L. A strain of *Bacillus subtilis* stimulates sunflower growth (*Helianthus annuus* L.) temporarily **Scientia**

